

글루타르알데하이드 고정 돼지 심낭에서 L-lysine을 이용한 Diamine Bridge 효과

김관창* · 최윤경* · 김수환** · 김용진**

Effect of Diamine Bridges Using L-lysine in Glutaraldehyde Treated Porcine Pericardium

Kwan-Chang Kim, M.D.*, Yun-Kyung Choi, M.D.*, Soo-Hwan Kim**, Yong-Jin Kim, M.D.**

Background: Various studies and experimental trials have been done to develop bioprosthetic devices to treat complex congenital heart disease due to the limited usage of homograft tissue. The purpose of the present study was to evaluate the effect of diamine bridges with using L-lysine, as compared with using ethanol. **Material and Method:** Porcine pericardium was fixed at 0.625% GA (commercial fixation). An interim step of ethanol (80%; 1 day at room temperature) or L-lysine (0.1 M; 2 days at 37°C) was followed by completion of the GA fixation (2 days at 4°C and 7 days at room temperature). The tensile strength and thickness of the porcine pericardium were measured, respectively. The treated pericardiums were implanted subcutaneously into three-week old Long-Evans rats for 8 weeks. The calcium content of the implants was assessed by atomic absorption spectroscopy and the histology. **Result:** Ethanol pretreatment (13.6±10.0 ug/mg, p=0.008), L-lysine pretreatment (15.3±1.0 ug/mg, p=0.002), and both treatment (16.1±11.1 ug/mg, p=0.012) significantly inhibited calcification, as compared with the controls (51.2±8.5 ug/mg). L-lysine pretreatment (0.18±0.02 mm, 1.20±0.30 kg f/5 mm) significantly increased the thickness and tensile strength, as compared with ethanol pretreatment (0.13±0.03 mm, 0.85±0.36 1.0 kg f/5 mm) (p<0.01, p=0.035). **Conclusion:** The diamine bridges using L-lysine seemed to decrease the calcification of porcine pericardium fixed with glutaraldehyde, and this was comparable with Ethanol. Additionally, it seemed to enhance the thickness and tensile strength.

(Korean J Thorac Cardiovasc Surg 2009;42:157-164)

Key words: 1. Xenograft
2. Bioprosthesis
3. Calcification
4. Graft preservation
5. Pericardium

서 론

폐동맥 판막 협착 혹은 형성 부전을 동반한 여러 선천

성 심장기형의 수술적 치료를 위하여, 다양한 종류의 우심실-폐동맥간 도관이 사용되었다. 하지만 수명(longevity), 유용성(availability), 손쉽게 다룰 수 있는 것(handling), 성

*이화여자대학교 의학전문대학원 흉부외과학교실

Department of Thoracic and Cardiovascular Surgery, School of Medicine, Ewha Womans University

**서울대학교 의과대학 흉부외과학교실, 서울대학교병원 임상의학연구소, 바이오 이중장기개발사업단

Department of Thoracic and Cardiovascular Surgery, Seoul National University College of Medicine, Seoul National University Hospital Clinical Research Institute, Xenotransplantation Research Center

†이 연구는 2008학년도 이화여자대학교 교내연구비 지원에 의한 연구임.

논문접수일 : 2008년 10월 22일, 심사통과일 : 2008년 11월 21일

책임저자 : 김관창 (158-710) 서울시 양천구 목6동, 이화여자대학교 목동병원 흉부외과

(Tel) 02-2650-5151, (Fax) 02-2649-4930, E-mail: mdkkchang@cwaha.ac.kr

본 논문의 저작권 및 전자매체의 지적소유권은 대한흉부외과학회에 있다.

장 잠재력(growth potential) 등을 만족하는 이상적인 도관은 아직 나오지 않고 있다. 특히 소아, 청소년 환자들의 성장에 따른 상대적인 협착이나, 도관 자체의 변성, 어린 환자에 비해 빠르게 진행되는 석회화로 인한 퇴행성 변화, 도관 내부의 껍질형성(intimal peel formation) 등으로 인한 도관 교체를 위한 잦은 재수술이 이들 환자군에서 중요한 문제로 여겨지고 있다. 최근까지 Dacron 도관에 조직판막 등을 사용한 합성 이종 이식편(Composite xenograft) 혹은 소의 심낭(bovine pericardium)을 사용한 이종 이식편을 많이 사용하여 왔으나 어린 연령일수록 석회화가 빨리 진행되어 조기 도관 실패로 이어지고 있다. 많은 연구 논문에서도 동종 이식편에 비해 이종 이식편 판막도관이 도관 지속율의 저하로 인한 조기 실패율이 높다는 것을 보고하고 있다[1-3]. 이러한 점에서 냉동 동종 이식편(cryopreserved homograft) 판막도관이 선호되나 알맞은 크기를 구하기 어렵고 공급원도 일정하지 않아 사용이 매우 제한적이다.

따라서 이종 조직의 석회화 방지를 위한 효과적인 기법의 확립이 필요하다. 지금까지 많은 연구들은 소나 돼지 심낭과 결합하는 glutaraldehyde의 aldehyde기(-CHO)가 체내의 칼슘과 반응하여 석회화가 일어나는 주 원인이 되고 있다고 판단하여[4,5], 이 aldehyde기의 결합부위를 미리 amino acid와 결합시켜(diamine bridge) 칼슘과 결합하는 것을 막아 줌으로써 석회화를 방지하고자 시도하였고 최근 L-lysine을 이용한 항석회화 연구가 활발히 진행 중이다 [6]. Ethanol은 조직 내 인지질(phospholipids)을 제거하고 콜라겐의 크기와 수를 감소시켜 영구적인 변화를 초래하여 항석회화 효과가 있는 것으로 알려져 있다[8].

본 연구에서는 소(생후 28개월~30개월)의 심낭(두께 0.29 ± 0.06 mm)에 비해 돼지(생후 3개월~4개월) 심낭(두께 0.13 ± 0.05 mm)이 소아환자에서 사용하는 것이 용이하고[9] 돼지 심낭에 대한 항석회화 연구가 부재하다는 점에 착안해서 돼지 심낭을 0.625% GA에 고정된 후, 80% Ethanol, L-lysine으로 항석회화 처리하였고, 이를 쥐의 피하조직에 이식하여 항석회화 효과를 알아보려고 하였다. 또한 석회화와 함께 기계적인 결합(mechanical failure)도 이종이식 보철편의 중장기 수술성적의 결합의 중요한 원인으로 알려져 있으므로[10,11], 각각의 돼지 심낭의 두께와, 장력을 이식 전에 측정하였다.

대상 및 방법

1) 이종이식 보철편의 제조

도살장에서 도살된 돼지(생후3개월~4개월)에서 즉시 심낭을 적출하여 PBS 용액(0.1 M, pH 7.4)에 넣어 ice box에 담아 실험실로 운반한다.

2) 실험군의 설정

총 6군으로 나누어 실험을 할 예정이며 각 군당 심낭 절편의 개수는 8개로 한다.

1군: 0.6% GA

2군: 0.6% GA + 80% Ethanol

3군: 0.6% GA + L-lysine

4군: 0.6% GA + 80% Ethanol + L-lysine

3) 이종이식 보철편 고정

돼지 심낭을 0.625% glutaraldehyde (PBS buffer, pH 7.4)에 담가 4°C에서 2일간 고정한 후, 상온에서 7일간 추가로 고정한다. 고정이 끝나면 심낭을 가로 세로 1.5 cm 크기의 심낭편들로 나누어서 더 이상의 처치가 필요하지 않은 심낭편들은 PBS 용액으로 상온에서 24시간 동안 세척한 후, 쥐에게 이식한다. 추가적인 항석회화 처치가 필요한 심낭편들은 바로 다음 단계로 진행한다.

4) Ethanol 전처리

0.6% glutaraldehyde 고정 처리를 마친 심낭편들을 80% ethanol (PBS buffer, pH 7.4)에 담긴 shaker bath에 넣어 상온에서 24시간 동안 처리한다. 더 이상의 처치가 필요하지 않은 심낭편들은 PBS 용액으로 상온에서 24시간 동안 세척한 후, 쥐에게 이식한다.

5) L-lysine 전처리

0.6% glutaraldehyde 고정 처리나 추가 Ethanol 처리를 마친 심낭편들을 PBS 용액으로 세척한 후, 0.1 M L-lysine solution (acetic acid buffer, 0.5 M, pH 7.6)에 담가 37°C에서 48시간 동안 처리한다. 이후 PBS solution으로 상온에서 24시간 동안 세척한 후, 쥐에게 이식할 때까지 4°C의 PBS 용액에 보관한다.

6) Purpald 검사, 두께, 장력검사

각 군당 1개의 심낭편들은 쥐에게 이식하지 않고 광학 및 전자현미경으로 미세구조를 관찰한다. L-lysine으로 glu-

taraldehyde detoxification 처리를 한 심낭편에서 detoxification이 적절히 이루어졌는지 알아보기 위해 aldehyde residue evaluation을 위한 검사를 한다. 이를 위해서 심낭편을 saline으로 세척한 후 0.171 M Purpald in 1 M NaOH solution에 15분간 soaking한 후 공기 중에 노출시켜 심낭편의 색이 변하는데 걸리는 시간 및 보라색의 정도를 정성적으로 분석한다. Detoxification 처리를 하지 않은 심낭편들에도 같은 검사를 해서 그 결과를 비교한다.

처리된 돼지 심낭을 펼치고 30°C씩 각도를 달리하여서 얻을 수 있는 모두 6가지의 방향에 대해 0.5×5 cm의 장방향 절편을 취하여서 폭 5 mm에 대한 인장강도를 측정함으로써 그를 평균한 값이 그 심낭의 인장강도의 대표값이 되도록 시도하였다. 장력의 측정은 Japan Tech& Manufacture, Digital Force Gauge, Model 5 FGN, automated materials testing system을 이용 load speed 100 mm/min로 측정하여 단위는 kg중/폭5 mm로 표기하였다. 또한 심낭의 두께와 장력과의 관계를 보기 위하여 캘리퍼스 Mitutoyo Thickness Gauge (Digimatic 543-122-15, Mitutoyo, Japan)로 표본들의 두께도 한 샘플에서도 여러 번 동시에 측정하였다.

7) 쥐 이식 모델

Zoletil (0.2 cc IP), Rompun (0.1 cc IP)으로 쥐를 마취한 다음 등 부위 피하조직에 4개의 pouch를 만든 후, 각각의 pouch에 위의 방법대로 처리한 심낭편들을 임의로 이식한 후 상처를 봉합한다. 심낭편 이식 후 8주가 지나면 실험을 종료하게 되며, Thiopental (300 mg/kg IP)로 쥐를 마취한다. 이식 시에 만들었던 pouch를 박리하여 심낭편들을 적출해낸다. 적출해낸 각각의 심낭편들을 3등분하여 결과 분석에 사용하게 된다.

8) Vonkossa 염색

광학 현미경적 검사는 적출된 심낭을 2~3 mm 두께의 조직으로 잘라 Dubosq-brasil 용액에 1시간 넣어두었다가 10% 포르말린에 후고정한 후 파라핀포매조직을 만들어 2~4 μ m 절편으로 박절하여 hematoxylin-eosin 및 vonkossa 염색하여 조직학적 소견과 칼슘 침착의 정도를 알아본다.

9) 칼슘 정량

각 군의 심낭편의 석회화 정도를 알아보기 위해 칼슘 정량을 시행한다. 이를 위해서 심낭편을 생리식염수로 세척한 후 24시간 이상 freeze dryer (Labconco, U.S.A.)에서

냉동 건조시킨 후 각각 조직의 무게를 측정한다. 2 mL Effendorf tube에 담아 6 N HCl 용액 1 mL를 첨가하고 60°C warm incubator (비준과학)에서 가온하며 완전 용해 될 때까지 24시간 이상 기다린다. 이 조직 용액에 Lanthanum (Sigma Co., U.S.A.) 용액(5% Lanthanum, 3 N HCl)을 첨가하여 모두 2 mL가 되도록 표준화한 후, 표준 칼슘 용액(in 0.5% Lanthanum, 0.6 N HCl)을 이용 atomic absorption spectrophotometer (Perkin-Elmer, U.S.A.)로 칼슘을 정량 한다.

10) 통계 방법

통계처리는 Microsoft excel과 SPSS 14.0 K를 사용하였고, 모든 통계수치는 평균±표준편차로 표시하였다. 각 군 간의 평균치 비교는 Student T-test로 검증하였고 각 군 간의 통계적 차이는 ANOVA 및 post-hoc test (Turkey test)로 검증하였으며 $p < 0.05$ 를 의미 있는 것으로 간주한다.

결 과

1) Tensile strength test

0.625% glutaraldehyde 고정 후에 L-lysine 처리한 군이 1.20 ± 0.30 kg 중/5 mm로 가장 강했으며 0.625% glutaraldehyde 고정 후에 80% Ethanol과 L-lysine 모두 처리한 군 0.90 ± 0.22 kg 중/5 mm, 0.625% glutaraldehyde 고정 후에 80% Ethanol 처리한 군이 0.85 ± 0.36 kg 중/5 mm, 0.625% glutaraldehyde 고정만 시행한 군이 0.53 ± 0.34 kg 중/5 mm로 가장 약했다. 각 군들간에 통계적으로 유의한 차이가 있었다($p=0.035$)(Fig. 1).

2) Thickness

0.625% glutaraldehyde 고정 후에 L-lysine 처리한 군이 0.18 ± 0.02 mm로 가장 두꺼웠으며, 0.625% glutaraldehyde 고정 후에 80% Ethanol 처리한 군이 0.13 ± 0.03 mm, 0.625% glutaraldehyde 고정 후에 80% Ethanol과 L-lysine 모두 처리한 군이 0.12 ± 0.01 mm, 0.625% glutaraldehyde 고정만 시행한 군이 각각 0.10 ± 0.02 mm로 가장 얇았다. 각 군들간에 통계적으로 유의한 차이가 있었다($p < 0.01$)(Fig. 2).

3) Purpald 검사

돼지 심낭을 0.625% glutaraldehyde 고정 후에 L-lysine 처리한 군과 0.625% glutaraldehyde 고정 후에 80% Ethanol과 L-lysine 처리한 군에서 약한 보라색을 띠었고 0.625% glutaraldehyde 고정만 시행한 군과 0.625% glutaraldehyde

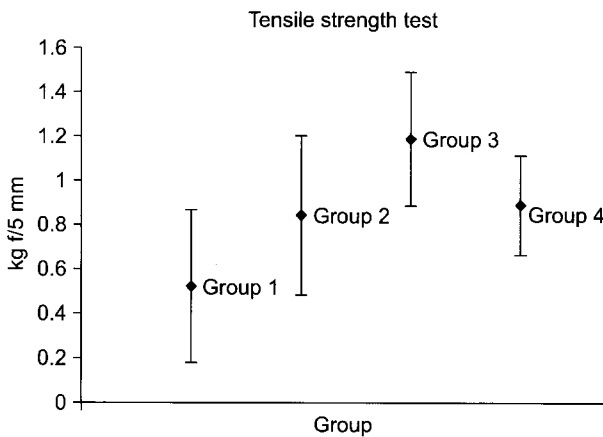


Fig. 1. The tensile strength of porcine pericardium after Group 1) glutaraldehyde (0.625%) fixation, Group 2) glutaraldehyde (0.625%) fixation+ethanol (80%) treatment, Group 3) glutaraldehyde (0.625%) fixation+L-lysine treatment, Group 4) glutaraldehyde (0.625%) fixation+ethanol (80%) treatment+L-lysine treatment. The tensile strength of porcine pericardium showed a statistically significant difference between groups ($p=0.035$).

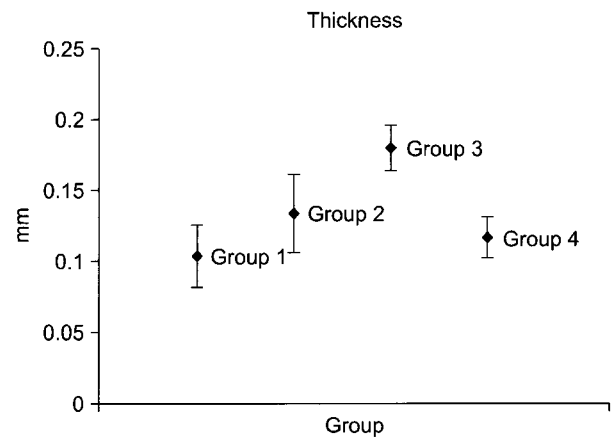


Fig. 2. The thickness of porcine pericardium after Group 1) glutaraldehyde (0.625%) fixation, Group 2) glutaraldehyde (0.625%) fixation+ethanol (80%) treatment, Group 3) glutaraldehyde (0.625%) fixation+L-lysine treatment, Group 4) glutaraldehyde (0.625%) fixation+ethanol (80%) treatment+L-lysine treatment. The thickness of porcine pericardium showed a statistically significant difference between groups ($p<0.01$).

고정 후에 80% Ethanol 처리한 군에서 가장 진한 보라색을 띠었다(Fig. 3).

4) Vonkossa stain

심낭은 장막층, 섬유층, 심외막 결합조직으로 이루어져 있었으며 섬유층이 심낭의 대부분의 두께를 차지 하였고 콜라겐, 탄력섬유(elastic fibers), 신경, 혈관들, 림프관들로 이루어져 있었다. 칼슘은 주로 심외막 결합조직에 주로 침착 되어 있었고 일부는 섬유층 내로 침범하고 있었다. 0.625% glutaraldehyde 고정만 시행한 군에서는 거의 전 층에서 칼슘이 침착 되어 있었으며 0.625% glutaraldehyde 고정 후에 80% Ethanol 처리한 군, 0.625% glutaraldehyde 고정 후에 L-lysine 처리한 군, 0.625% glutaraldehyde 고정 후에 80% Ethanol과 L-lysine 처리한 군은 세 층이 비교적 잘 유지되면서 주로 심외막 결합조직 내에 칼슘의 침착이 관찰되었다(Fig. 4).

5) Calcium 정량

돼지 심낭을 0.625% glutaraldehyde 고정 후에 80% Ethanol 처리한 군이 13.6 ± 10.0 ug/mg으로 가장 작았고 0.625% glutaraldehyde 고정 후에 L-lysine 처리한 군이 15.3 ± 1.0

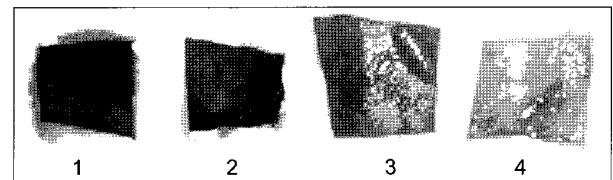


Fig. 3. Porcine pericardium with Purpald test after 1) glutaraldehyde (0.625%) fixation, 2) glutaraldehyde (0.625%) fixation+ethanol (80%) treatment, 3) glutaraldehyde (0.625%) fixation+L-lysine treatment, 4) glutaraldehyde (0.625%) fixation+ethanol (80%) treatment+L-lysine treatment.

ug/mg, 0.625% glutaraldehyde 고정 후에 80% Ethanol과 L-lysine 처리한 군이 16.1 ± 11.1 ug/mg, 0.625% glutaraldehyde 고정만 시행한 군이 51.2 ± 8.5 ug/mg로 가장 많았다.

0.625% glutaraldehyde 고정만 시행한 군과 비교하여 0.625% glutaraldehyde 고정 후에 80% Ethanol 처리한 군 ($p=0.008$)과, 0.625% glutaraldehyde 고정 후에 L-lysine 처리한 군($p=0.002$), 그리고 0.625% glutaraldehyde 고정 후에 80% Ethanol과 L-lysine 처리한 군($p=0.012$)은 통계적으로 의미 있게 칼슘의 침착량이 적었다(Fig. 5).

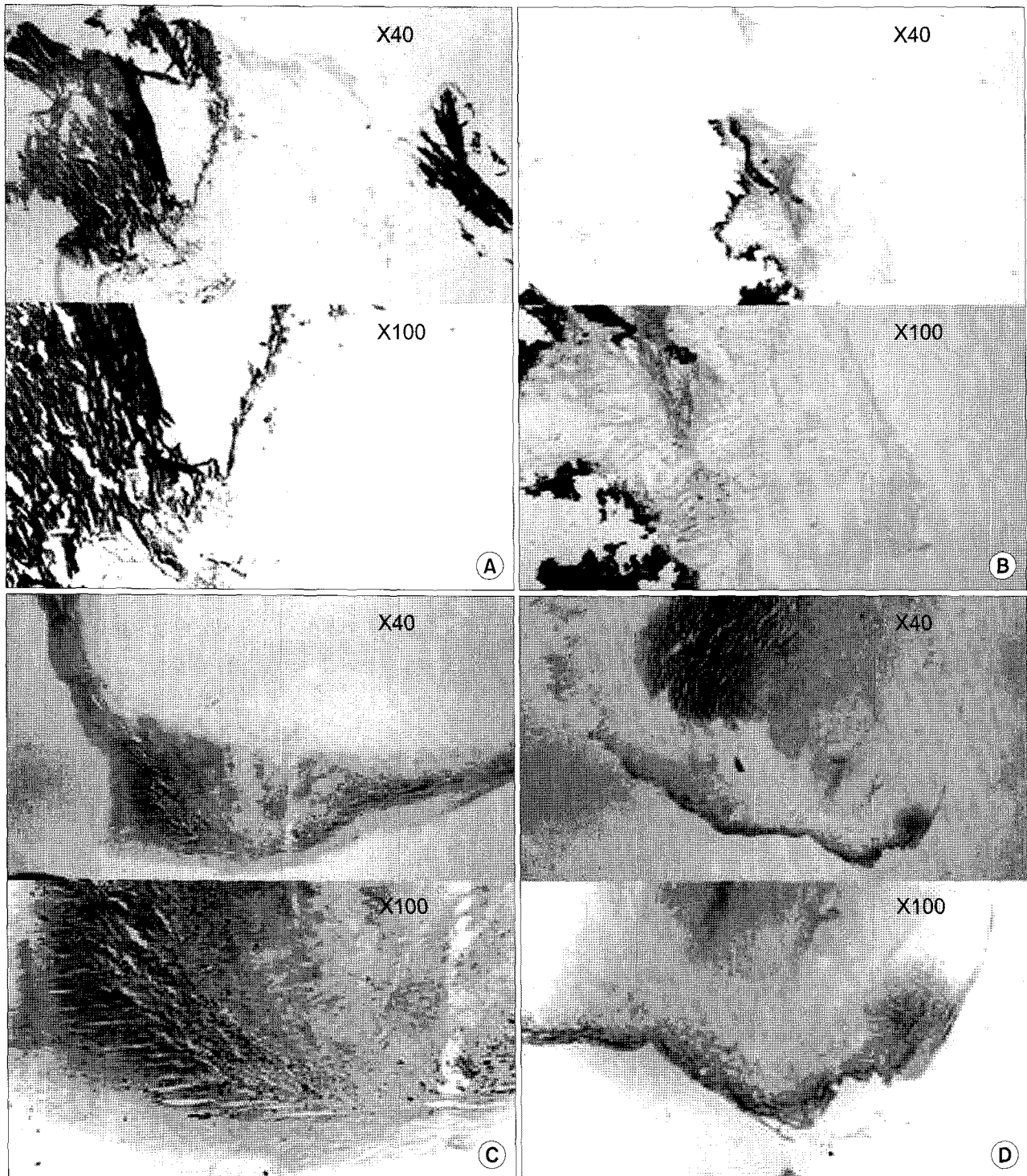


Fig. 4. Harvested porcine pericardium with Vonkossa staining after (A) glutaraldehyde (0.625%) fixation, (B) glutaraldehyde (0.625%) fixation + ethanol (80%) treatment, (C) glutaraldehyde (0.625%) fixation + L-lysine treatment, (D) glutaraldehyde (0.625%) fixation + ethanol (80%) treatment + L-lysine treatment.

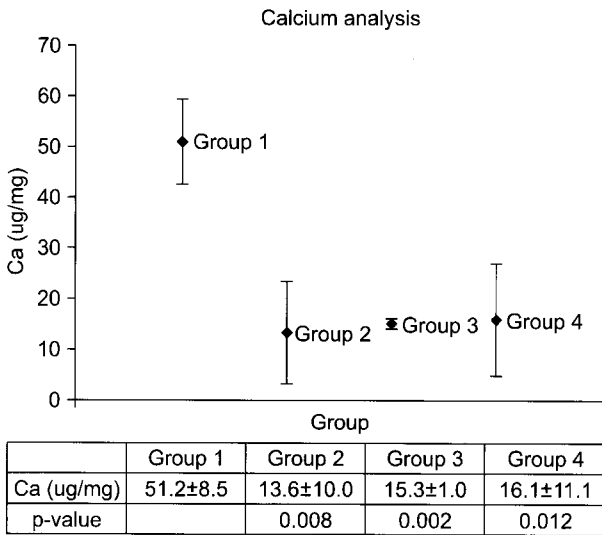


Fig. 5. [3]Calcium analysis of harvested porcine pericardium after Group 1) glutaraldehyde (0.625%) fixation, Group 2) glutaraldehyde (0.625%) fixation+ethanol (80%) treatment, Group 3) glutaraldehyde (0.625%) fixation+L-lysine treatment, Group 4) glutaraldehyde (0.625%) fixation+ethanol (80%) treatment+L-lysine treatment.

고찰

폐동맥 판막 협착 혹은 폐동맥 판막 형성 부전을 동반한 선천성 심기형 질환에서 우심실-폐동맥간 연결을 위한 도관의 사용은 1964년 Kirklin 등에 의하여 처음 시도되었으며, 이후 Ross 등은 1966년 동종 대동맥 이식편을 이용하여 대동맥 및 폐동맥 판막을 치환하는 수술을 시작하였다[12,13]. 동종 이식편의 공급의 제한으로 여러 저자들은 다양한 종류의 이종 판막, 심낭을 이용하여 만들어진 도관을 개발, 사용해왔다[14-17]. 동종 이식편을 비롯하여 인공적으로 개발된 이러한 도관을 소아에게 적용할 때에는 몇 가지 고려해야 할 점들이 있다. 먼저, 이러한 도관들은 주로 소아 환자에게 사용되므로 환자의 성장에 따른 상대적인 협착이 발생할 수 있어, 이로 인해 추가적으로 발생하는 재수술을 피하기 힘들다. 또, 새로 삽입한 도관에 자연적으로 생기게 되는 석회화 등의 퇴행성 변화는, 어른에 비하여 대사가 더 활발한 성장기의 소아 환자들에게 있어서 더욱 그 진행 속도가 빠르다고 할 수 있다. 이와 관련하여, 인공적으로 개발된 여러 판막을 포함한 도관들을 사람에게 적용하기 위하여 다양한 종류의 화학적, 면역학적인 과정을 거치게 되는데, 이러한 과정에서 처리했던 여러 가지 물질들이 시간이 흐름에 따라 도관의 퇴

행성 변화를 더 조장할 수 있음이 밝혀지고 있다[18]. 이러한 점들은 지금까지 개발된 다양한 종류의 도관 수술 성적을 설명할 수 있는 요인들이라고 할 수도 있다. Dacron 도관에 상포화된 판막을 삽입한 도관의 10년째 재수술로부터의 자유도가 53.3%로, Carpentier Edward 도관은 60.1%로 보고 되고 있다. Shelhigh 도관의 경우, 모든 크기의 도관에서 5년 동안의 추적 관찰 결과 25% 이상의 재수술율을 보고 하였고 특히 16 mm 크기의 경우 5년째 재수술율이 55%로 보고 되었다[19].

이러한 이종 조직 보철편들은 glutaraldehyde (GA)에 고정 보존하는 방법이 일반적으로 이용되고 있는데, 이는 조직의 교원섬유들이 GA와 안정된 cross-link를 이루며 GA polymer를 표면에 형성하는 것을 이용한 것이지만, 이 GA의 자유 aldehyde기(-CHO)가 칼슘과 결합하는 것이 석회화의 주 원인으로 생각되고 있어[4,5] 이 aldehyde기의 결합부위를 미리 amino acid와 결합시켜(diamine bridge) 칼슘과 결합하는 것을 막아 줌으로써 석회화를 방지하고자 시도하였고 최근 L-lysine을 이용한 항석회화 연구가 활발히 진행 중이다[6]. Ethanol은 조직 내 인지질(phospholipids)을 제거하고 콜라겐의 크기와 수를 감소시켜 영구적인 변화를 초래하여 항석회화 효과가 있는 것으로 알려져 있다[8]. 본 연구에서는 0.625% glutaraldehyde 고정한 돼지 심낭을 80% Ethanol, L-lysine으로 항석회화 처리를 한 후, 각각의 이종 이식 편들의 두께와 장력을 측정하였고 또한 이를 쥐의 피하조직에 이식하여 그 효과를 알아 보았다. Ethanol, L-lysine, 그리고 Ethanol과 L-lysine을 모두 처리한 군에서만 GA 고정만 시행한 군에 비해 통계적으로 유의하게 칼슘의 침착이 적었지만 세 군간에는 차이가 없었다. 본 연구에서는 0.1 M L-lysine을 사용하였는데 이 농도는 소 심낭 혹은 돼지의 대동맥을 대상으로 하는 다른 연구에서 참조하였다. 소(생후28개월~30개월) 심낭의 두께가 0.29±0.06 mm로 돼지(생후 3개월~4개월) 심낭의 두께 0.13±0.05 mm에 비해 2배 이상이므로[9] 이를 감안하여 적절한 L-lysine의 농도를 조정한다면 Ethanol만 처리한 군과 차이가 날 수 있을 것이다. 이식 전 시행한 두께와 장력검사에서 L-lysine을 처리한 군이 Ethanol 처리한 군에 비해 좋은 결과를 보였다. 이는 추가적인 Diamine bridge의 효과로 Cross-link가 늘어난 것으로 해석된다. 한편 Purpald test 결과에서는 Ethanol만 처리한 군은 GA 고정만 시행한 군과 비슷한 진한 보라색을 띠 반면, L-lysine만 처리하거나 Ethanol과 L-lysine 모두를 처리한 군은 연한 보라색을 띠었다. 이는 L-lysine 처리를 통해 효과적으로 GA

의 자유 aldehyde기(-CHO)를 제거하였음을 보여 준다. 결국 이종 이식편의 석회화에는 GA의 자유 aldehyde기 외에 여러 가지 반응이 작용하며 이를 억제하기 위하여 작용기전이 다른 Ethanol과 L-lysine를 같이 처리하는 것이 추천 된다. 본 연구에서 쥐의 피하 조직에 항석회화 처리를 한 돼지 심낭 이식편을 이식하여 8주간 관찰하였다. 쥐의 수명은 2~3년 정도이고 생후 3주까지를 포유기로, 생후 3주에서 14주까지를 성장기로 나누고 생후 14주 이후 성체가 된다. 어린 나이 일수록 석회화가 빨리 진행되는 것으로 알려져 있으므로 본 연구에서는 생후 3주 연령의 쥐를 사용하였다. 일반적으로 이종 이식편의 기능은 콜라겐 골격 유지 정도와 내구성에 의해 좌우되는 것으로 알려져 있으며[20], 본 실험에서 돼지심낭 보철 편은 여러 조건하의 고정 방법들에 따라 콜라겐 골격의 현미경적 구조에서 확연한 차이를 보이지 않아, GA를 이용한 각종 조직 처리과정 중 조직손상에 의한 구조적, 기계적 손실은 없는 것으로 생각되었다.

결 론

심장 수술의 증가에 따르는 보철편의 수요 증가가 계속 되는 상황에서 인공 보철 편들과 타 동물로부터 채취 제작한 보철 편들은 정도의 차이는 있지만 심장 내 이식 후 석회화의 진행에 따르는 중장기 수술 성적의 미흡함이 계속 문제점으로 남아 있다. 본 저자들은 0.625% glutaraldehyde 고정한 돼지 심낭을 L-lysine으로 항석회화 처리를 한 후, 이를 쥐의 피하조직에 이식하여 그 효과를 알아 보았다. 이렇게 확립된 항석회화 처리기법은 다음 단계인 대동물 실험을 통하여 그 효과를 재 검증할 수 있을 것이며, 궁극적으로는 영아나 소아의 우심실유출에 이식할 수 있는 이종 조직판막 혹은 판막도관의 제조 및 상품화를 기대할 수 있을 것이다.

참 고 문 헌

- Jamieson WRE, Rosado LJ, Munro AI, et al. Carpentier Edwards standard porcine bioprosthesis: primary tissue failure (structural valve deterioration) by age groups. *Ann Thorac Surg* 1988;46:155-62.
- David TE, Ivanov J. Is degenerative calcification of the native aortic valve similar to calcification of bioprosthetic heart valves? *J Thorac Cardiovasc Surg* 2003;126:939-41.
- Human P, Zilla P. Characterization of the immune response to valve bioprostheses and its role in primary tissue failure. *Ann Thorac Surg* 2001;71(Suppl):S385-8.
- Maranto A, Schoen F. Alkaline phosphatase activity of glutaraldehyde-treated bovine pericardium used in bioprosthetic cardiac valves. *Circ Res* 1988;63:844-8.
- Zilla P, Weissenstein C, Bracher M, et al. High glutaraldehyde concentrations reduce rather than increase the calcification of aortic wall tissue. *J Heart Valve Dis* 1997;6:502-9.
- Humana P, Bezuidenhouta D, Torriannib M, Hendriks M, Zilla P. Optimization of diamine bridges in glutaraldehyde treated bioprosthetic aortic wall tissue. *Biomaterials* 2002; 23:2099-103.
- Lee CH, Vyavahare N, Zand R, et al. Inhibition of aortic wall calcification in bioprosthetic heart valves by ethanol pretreatment: biochemical and biophysical mechanisms. *J Biomed Mater Res* 1998;42:30-7.
- Kim KC, Lee C, Choi CH, et al. Development of porcine pericardial heterograft for clinical application (tensile strength-thickness). *Korean J Thorac Cardiovasc Surg* 2008; 41:170-6.
- Neethling WM, Hodge AJ, Clode P, Glancy R. A multi-step approach in anti-calcification of glutaraldehyde-preserved bovine pericardium. *J Cardiovasc Surg (Torino)* 2006;47:711-8.
- Garcia Paez JM, Jorge-Herrero E, Carrera A, et al. Chemical treatment and tissue selection: factors that influence the mechanical behaviour of porcine pericardium. *Biomaterials* 2001;22:2759-67.
- Ross DN, Somerville J. Correction of pulmonary atresia with a homograft aortic valve. *Lancet* 1966;288:1446-7.
- Ross DN. Replacement of the aortic and mitral valves with a pulmonary autograft. *Lancet* 1967;290:956-8.
- Merin G, McGoon DC. Reoperation after insertion of aortic homograft as a right ventricular outflow tract. *Ann Thorac Surg* 1973;16:122-6.
- Bowman FO Jr, Hancock WD, Malm JR. A valve-containing Dacron prosthesis: its use in restoring pulmonary artery-right ventricular continuity. *Arch Surg* 1973;107:724-8.
- Agarwal KC, Edwards WD, Feldt RH, et al. Clinicopathological correlates of obstructed right-sided porcine-valved extracardiac conduits. *J Thorac Cardiovasc Surg* 1981;81: 591-601.
- Jonas RA, Freed MD, Mayer JE Jr, et al. Long term follow-up of patients with synthetic right heart conduits. *Circulation* 1985;72(Suppl 2):77-83.
- Park SS, Kim WH, Kim KH, et al. Removal of α -Gal epitopes in aortic valve and pericardium of pig using green coffee bean α -Galactosidase. *Korean J Thorac Cardiovasc Surg* 2008;41:12-24.
- Kwak JG, Yoo JS, Kim YJ, et al. Twenty-one year experience with right ventricle to pulmonary artery conduit interposition. *Korean J Thorac Cardiovasc Surg* 2008;41:417-22.
- Schoen FJ. Future directions in tissue heart valves: impact of recent insights from biology and pathology. *J Heart Valve Dis* 1999;8:350-8.

=국문 초록=

배경: 폐동맥 판막 협착 혹은 형성 부전을 동반한 여러 선천성 심장기형의 수술적 치료를 위하여, 다양한 종류의 우심실-폐동맥간 도관이 사용되었다. 장기 성적이 우수한 냉동동종 이식편(cryopreserved homograft)의 공급의 제한으로 이를 대체할 이종 조직 이식편의 석회화 방지를 위한 효과적인 기법의 확립이 필요하다. 본 연구에서는 L-lysine을 이용한 diamine bridge의 항석회화 효과를 Ethanol과 비교하여 알아 보고자 하였다. 대상 및 방법: 0.625% glutaraldehyde (4°C에서 2일, 상온에서 7일간) 고정된 돼지 심낭을 80% Ethanol (상온에서 1일), 혹은 0.1 M L-lysine (37°C에서 2일)로 처리 한 후 각각의 두께(thickness)와 장력(tensile strength)을 측정하였다. 각각의 항석회화 처리한 돼지심낭을 생후 3주된 쥐의 피하조직에 이식하고 8주 뒤 칼슘을 정량하고 조직학적 소견을 관찰하였다. 결과: 0.625% glutaraldehyde 고정만 시행한 군(51.2 ± 8.5 ug/mg)과 비교하여 0.625% glutaraldehyde 고정 후에 80% Ethanol 처리한 군(13.6 ± 10.0 ug/mg, $p=0.008$)과, 0.625% glutaraldehyde 고정 후에 L-lysine 처리한 군(15.3 ± 1.0 ug/mg, $p=0.002$), 그리고 0.625% glutaraldehyde 고정 후에 80% Ethanol과 L-lysine 처리한 군(16.1 ± 11.1 ug/mg, $p=0.012$)은 통계적으로 의미 있게 칼슘의 침착량이 적었다. 0.625% glutaraldehyde 고정 후에 80% Ethanol 처리한 군의 두께와 장력은 각각 0.18 ± 0.02 mm, 1.20 ± 0.30 kg 중/5 mm로 0.625% glutaraldehyde 고정 후에 L-lysine 처리한 군의 0.13 ± 0.03 mm, 0.85 ± 0.36 1.0 kg 중/5 mm 보다 증가되어 있었다($p < 0.01$, $p=0.035$). 결론: L-lysine을 이용한 diamine bridge는 Ethanol과 비교하여 비슷한 항석회화 효과를 보여 주었으며 Cross-link를 증가시켜 이종 이식편의 두께와 장력을 증가시켜 주는 효과가 있었다.

- 중심 단어 : 1. 이종조직
2. 생체인공조직
3. 석회화
4. 장기보존
5. 심낭